



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

EP04/6415

REC'D 20 JUL 2004

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

03014143.6

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

PGI/EP200 4 / 0 0 6 4 1 5

Anmeldung Nr:
Application no.: 03014143.6
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 24.06.03
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Cognis Iberia, S.L.
Poligono San Vincente
08755 Castellbisbal,
(Barcelona)
ESPAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Extrakte von Litchi sinensis

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s)
revendiquée(s)

Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

A23L1/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PT RO SE SI SK TR LI

5

Extrakte von Litchi sinensis

Gebiet der Erfindung

- 10 Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der Nahrungsmittelergänzungsstoffe und betrifft spezielle botanische Extrakte mit einem hohen Gehalt an speziellen Wirkstoffen, ein neues Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung in verschiedenen Bereichen.

15

Stand der Technik

Extrakte der schalen von Pflanzen der Gattung *Sapindaceae*, speziell der Spezies *Litchi sinensis* (Sonn.) sind bekannt für ihren hohen Gehalt an Flavonderivaten, insbesondere an Hydrier- oder Oxidationsprodukten des 2-phenyl-4H-1-benzopyrans oder deren Derivaten, wie z.B. Flavanen, Flavan-3-olen (Catechinen, Catechinoligomeren), Flavan-3,4-diolen (Leucoanthocyaniden), Flavonen, Flavonolen and Flavononen. Den Hauptanteil der Extrakte stellen jedoch kondensierte Tannine, sogenannte "oligomere Procyanodole" (OPC) dar. Es handelt sich dabei um Oligomere mit 2 bis 8 Monomeren vom Catechin- oder Epicatechintyp, wie z.B. Procyanidine, Proanthocyanidine, Procyanidoel, Oligoprocyanidine, Leucoanthocyanidine, Leucodelphinine, Leucocyanine sowie Anthocyanogene. OPC, insbesondere das besonders wirksame Proanthocyanidin A2 (OPC A2), zeigen Eigenschaften, die denen des Vitamins P ähneln, insbesondere die Inhibierung Matrixmetalloproteasen (MMP), MMP haben aber die Eigenschaft, die dermalen Makromoleküle des Bindegewebes, wie Proteoglycan, Collagen und Elastin anzugreifen, die Peptidbindungen zu lösen und damit ursächlich zur Hautalterung beizutragen. Auch bei inflammatorischen Prozessen in der Haut werden von den Makrophagen und von polymorphonuclearen neutrophilen Granulocyten Proteasen wie z.B. die Serin-Protease Elastase oder Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) wie Collagenase und eine weitere, zu den MMP gehörende Elastin abbauende Elastase ausgeschüttet.

35 In diesem Zusammenhang sei die europäische Patentanmeldung EP 0978274 A1 (Kibun) erwähnt, aus der kosmetische Zubereitungen für die topische Anwendung bekannt sind, die Emulgatoren vom Typ der Sphingoglycolipide zusammen mit Litchi-Extrakten enthalten, wobei letztere zur Depigmentierung der Haut dienen. Ferner werden in der Europäischen Patentanmeldung EP 0965328 A1 (Kao) kosmetische Mittel offenbart, die Litchi-Extrakte zusammen mit speziellen Phosphorsäurees-

tern enthalten. Keine der beiden Schriften enthält einen Hinweis, auf welche Weise Litchi-Extrakte hergestellt werden können oder auf deren orale Anwendung im Bereich der Nahrungsmittelergänzungsstoffe.

- 5 Die Herstellung von Lichi-Extrakten erweist sich in der Praxis als schwierig. Mit üblichen Techniken der Extraktion mit unterschiedlich polaren Lösemitteln werden nur Extrakte mit Gehalten bis zu 15 Gew.-% an OPC A2 erhalten, zu wenig, um die Extraktion wirtschaftlich durchzuführen und die Produkte unter ökonomisch vertretbaren Bedingungen zu vermarkten. Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung hat somit darin bestanden, Extrakte von *Litchi sinensis* sowie ein Verfahren zu deren
- 10 Herstellung zur Verfügung zu stellen, welche – bezogen auf die Aktivsubstanz – wenigstens 15, vorzugsweise wenigstens 20 und insbesondere 20 bis 25 Gew.-% an oligomeren Proanthocyanidinen des Typs OPC A2 aufweisen. Ein weitere Aufgabe der Erfindung hat darin bestanden, Nahrungsmittelzusatzstoffe zu entwickeln, welche bei oraler Aufnahme sowohl der Hautalterung als auch Entzündungserscheinungen entgegenwirken.

15

Beschreibung der Erfindung

- 20 Gegenstand der Erfindung sind pflanzliche Extrakte enthaltend – bezogen auf den Aktivsubstanzgehalt - wenigstens 15 und vorzugsweise 20 bis 25 Gew.-% an oligomeren Proanthocyanidinen des Typs OPC A2, die dadurch erhältlich sind, dass man

- (a) Schalen der Früchte von *Litchi sinensis* einer Extraktion mit niederen, gegebenenfalls
- 25 wässrigen aliphatischen Alkoholen unterwirft,
- (b) die Extrakte gegebenenfalls nach Konzentration und/oder Filtration einer chromatographischen Trennung unterzieht,
- (c) die bei der Chromatographie anfallende OPC A2-reiche Fraktion einer Flüssig/Flüssig-Extraktion unterwirft und
- 30 (d) die resultierende organische Phase abtrennt.

- Überraschenderweise wurde gefunden, dass durch Kombination der Prozessschritte „Extraktion“, „Chromatographie“ und „Flüssig/Flüssig-Extraktion“ nunmehr Extrakte zugänglich sind, die die OPC A2 in deutlich höheren Konzentrationen enthalten als Produkte des Stands der
- 35 Technik und die damit in ihrer MMP-inhibierenden und anti-inflammatorischen Wirkung deutlich leistungstärker sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung pflanzliche Extrakte enthaltend – bezogen auf den Aktivsubstanzengehalt - wenigstens 15 und vorzugsweise 20 bis 25 Gew.-% an oligomeren Proanthocyanidinen des Typs OPC A2, bei dem man

- 5 (a) Schalen der Früchte von *Litchi sinensis* einer Extraktion mit niederen, gegebenenfalls wässrigen aliphatischen Alkoholen unterwirft,
- (b) die Extrakte gegebenenfalls nach Konzentration und/oder Filtration einer chromatographischen Trennung unterzieht,
- (c) die bei der Chromatographie anfallende OPC A2-reiche Fraktion einer Flüssig/Flüssig-
10 Extraktion unterwirft und
- (d) die resultierende organische Phase abtrennt.

Extraktion

15 Die Herstellung der Extrakte kann in an sich bekannter Weise erfolgen, d.h. beispielsweise durch wässrigen, alkoholischen oder wässrig-alkoholischen Auszug der Pflanzen bzw. Pflanzenteile bzw. Schalen der Litchifrüchte. Geeignet sind alle herkömmlichen Extraktionsverfahren wie z.B. Mazeration, Remazeration, Digestion, Bewegungsmazeration, Wirbelextraktion,
20 Ultraschallextraktion, Gegenstromextraktion, Perkolation, Reperkolation, Evakolation (Extraktion unter vermindertem Druck), Diakolation oder Festflüssig-Extraktion unter kontinuierlichem Rückfluss. Für den großtechnischen Einsatz vorteilhaft ist die Perkulationsmethode. Als Ausgangsmaterial wird vorzugsweise von Litchischalen ausgegangen, die vor der Extraktion mechanisch zerkleinert werden können. Hierbei eignen
25 sich alle dem Fachmann bekannten Zerkleinerungsmethoden, als Beispiel sei die Gefriermahlung genannt. Als Lösungsmittel für die Durchführung der Extraktionen können organische Lösungsmittel, Wasser (vorzugsweise heißes Wasser einer Temperatur von über 80 °C und insbesondere von über 95 °C) oder Gemische aus organischen Lösungsmitteln und Wasser, insbesondere niedermolekulare Alkohole mit mehr oder weniger hohen
30 Wassergehalten, verwendet werden. Besonders bevorzugt ist die Extraktion mit Methanol, Ethanol sowie deren wässrigen Gemischen. Die Extraktion erfolgt in der Regel bei 20 bis 100 °C, bevorzugt bei 50 bis 70 °C. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Extraktion unter Inertgasatmosphäre zur Vermeidung der Oxidation der Wirkstoffe des Extraktes. Dies ist insbesondere bei Extraktionen bei Temperaturen über 40 °C von Bedeutung. Die
35 Extraktionszeiten werden vom Fachmann in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial, dem Extraktionsverfahren, der Extraktionstemperatur, vom Verhältnis Lösungsmittel zu Rohstoff u.a. eingestellt. Nach der Extraktion können die erhaltenen Rohextrakte gegebenenfalls weiteren üblichen Schritten, wie beispielsweise Aufreinigung, Konzentration und/oder Entfärbung unterzogen werden. Falls wünschenswert, können die so hergestellten Extrakte

stellten Extrakte beispielsweise einer selektiven Abtrennung einzelner unerwünschter Inhaltsstoffe, unterzogen werden. Die Extraktion kann bis zu jedem beliebigen Extraktionsgrad erfolgen, wird aber gewöhnlich bis zur Erschöpfung durchgeführt. Typische Ausbeuten (= Trockensubstanzmenge des Extraktes bezogen auf eingesetzte Rohstoffmenge) bei der Extraktion der Litschischalen liegen bezogen auf OPC A2 im Bereich von 2 bis 3 Gew.-%.

Chromatographie und Flüssig/Flüssig Extraktion

Die chromatographische Reinigung und die Flüssig/Flüssig-Extraktion können in an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Als Säulenmaterial für die Chromatographie haben sich Harze bewährt, die keine funktionellen Gruppen tragen. Die Trennung wird vorzugsweise bei 15 bis 30 °C durchgeführt, wobei als Laufmittel vor allem niedere aliphatische Alkohole mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere Methanol oder Ethanol in Betracht kommen. Für die nachfolgende Extraktion haben sich mit Wasser nicht mischbare Lösemittel bewährt, wie beispielsweise Butanol oder Ethylacetat. Die Extraktion wird dabei vorzugsweise bei Temperaturen von wenigstens 25 °C durchgeführt, wobei sich die obere Grenze aus dem Siedepunkt des Lösemittels ergibt.

Gewerbliche Anwendbarkeit

Extrakte von *Litchi sinensis* im allgemeinen und die OPC A2-angereicherten neuen Extrakte im besonderen, verfügen gegenüber Produkten des Stands der Technik über eine höhere MMP-Inhibierung und eignen sich, beispielsweise unter dem Oberbegriff „cosmetic inside“ zur Herstellung von Nahrungsmittelergänzungstoffen. In einer besonderen Darreichungsform werden die Extrakte in verkapselter Form, z.B. als Gelatinekapseln, oder in mikroverkapselter Form eingesetzt. Geeignete Mikrokapseln mit Durchmessern in Bereich von 0,0001 bis 5 mm und Verfahren zu deren Herstellung sind beispielsweise den Druckschriften WO 01/01926, WO 01/01927, WO 01/01928, und WO 01/01929 (Primacare) zu entnehmen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft des weiteren die Verwendung der neuen OPC-A2 reichen Extrakte zur Herstellung von kosmetischen und/oder pharmazeutischen Zubereitungen, in denen sie in Mengen von 0,1 bis 10, vorzugsweise 0,5 bis 5 und insbesondere 1 bis 2 Gew.-% enthalten sein können.

Beispiele

Beispiel 1

5

In einem 50-l-Reaktor wurden 3 kg zerkleinerte Schalen von *Litchi sinensis* mit einem Gehalt an OPC A2 von 0,4 Gew.-% vorgelegt und mit 30 kg wässrigen Methanol 60 min bei 50 °C extrahiert. Es wurden 23 kg einer Flüssigkeit mit einem Feststoffgehalt von 500 g erhalten, welcher einen OPC A2 Gehalt von 2 Gew.-% aufwies. Nach Aufkonzentrieren des Extraktes auf ein Volumen von 1,5 kg wurde die Flüssigkeit einer chromatographischen Reinigung bei 25 °C auf einer Säule mit einem Belag ohne funktionelle Gruppen und unter Einsatz von Ethanol als Laufmittel unterworfen, bei der 2,5 kg Extrakt mit einem Feststoffanteil von 80 g erhalten wurde. Der Extrakt wurde erneut bis auf ein Volumen von 500 g eingeeengt und dann bei 45 °C einer Flüssig/Flüssig-Chromatographie mit wässrigem Butanol unterworfen. Während die intensiv rot gefärbte wässrige Phase nur – bezogen auf den Aktivsubstanzzgehalt - Mengen kleiner 1 Gew.-% an OPC A2 aufwies, wurden 50 g einer leicht rötlich gefärbten organischen Phase erhalten, welche – bezogen auf den Aktivsubstanzzgehalt - einen Gehalt an OPC A2 von 23 Gew.-% aufwies.

20

Vergleichsbeispiel V1

Analog Beispiel 1 wurden in einem 50-l-Reaktor 3 kg zerkleinerte Schalen von *Litchi sinensis* mit einem Gehalt an OPC A2 von 0,4 Gew.-% vorgelegt und mit 30 kg wässrigem Methanol 60 min bei 50 °C extrahiert. Nach Abtrennen des Methanols wurde ein Rückstand von 500 g erhalten, der in 1,5 l destilliertem Wasser aufgenommen wurde. Anschließend wurde diese Lösung mehrfach mit in Summe 3 l Ethylacetat extrahiert. Dabei wurde nach Trennung eine leicht rötlich gefärbte organische Phase erhalten, welche – bezogen auf den Aktivsubstanzzgehalt - einen Gehalt an OPC A2 von 10 Gew.-% aufwies.

30

Wirksamkeit gegen Proteasen

Während einer Inflammation, werden aus den polymorphonuclearen neutrophilen Granulocy-
ten oder Makrophagen Hautproteasen, wie beispielsweise Collagenase freigesetzt. Ein ähnli-
5 cher Vorgang spielt sich gerade in der Haut älterer Menschen bei Einfluss von UV-Strahlen
ab. Die Proteasen – wegen ihres Gehaltes an zentralen Zinkionen auch als Matrix-Metallo-
Proteasen (MMP) bezeichnet – katalysieren wie schon erwähnt die Fragmentierung von Bin-
degewebsproteinen. Zur Untersuchung der Testsubstanzen auf Collagenaseinhibierung wurde
bakterielle Collagenase (*Clostridium histolyticum*) auf Gelatine als natürlichem Nährboden
10 verwendet, welche mit Fluorochrom (FITC, Calbiochem) markiert war. Die Inkubationszeit
betrug 60 min bei 20 °C, die Hydrolyse des Substrates wurde über die Fluoreszenz bei 393 nm
(Anregung bei 328 nm) verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Angege-
ben ist die Collagenase-Inhibierung in %.

15

Tabelle 1
Collagenase-Inhibierung (Angabe in %-rel.)

Bsp.	<u>Testprodukt</u>	Konzentration % (w/v)		
		0,001	0,005	0,01
2	Produkt gemäß Beispiel 1	18	46	67
V2	Produkt gemäß Beispiel V1	11	27	34

Die Ergebnisse zeigen, dass die erfindungsgemäßen Testsubstanzen in Abhängigkeit der Kon-
20 zentration über eine signifikante Inhibierungswirkung verfügen.

Patentansprüche

EPO - Munich
3
24. Juni 2003

1. Pflanzliche Extrakte enthaltend – bezogen auf den Aktivsubstanzgehalt - wenigstens 15 Gew.-% an oligomeren Proanthocyanidinen des Typs OPC A2, dadurch erhältlich, dass man
- (a) Schalen der Früchte von *Litchi sinensis* einer Extraktion mit niederen, gegebenenfalls wässrigen aliphatischen Alkoholen unterwirft,
- (b) die Extrakte gegebenenfalls nach Konzentration und/oder Filtration einer chromatographischen Trennung unterzieht,
- (c) die bei der Chromatographie anfallende OPC A2-reiche Fraktion einer Flüssig/Flüssig-Extraktion unterwirft und
- (d) die resultierende organische Phase abtrennt.
2. Extrakte nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie 20 bis 25 Gew.-% OPC A2 enthalten.
3. Verfahren zur Herstellung pflanzlicher Extrakte mit wenigstens 15 Gew.-% an oligomeren Proanthocyanidinen des Typs OPC A2, bei dem man
- (a) Schalen der Früchte von *Litchi sinensis* einer Extraktion mit niederen, gegebenenfalls wässrigen aliphatischen Alkoholen unterwirft,
- (b) die Extrakte gegebenenfalls nach Konzentration und/oder Filtration einer chromatographischen Trennung unterzieht,
- (c) die bei der Chromatographie anfallende OPC A2-reiche Fraktion einer Flüssig/Flüssig-Extraktion unterwirft und
- (d) die resultierende organische Phase abtrennt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man gegebenenfalls wässrigen Methanol oder Ethanol einsetzt.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und/oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass man die Extraktion bei Temperaturen im Bereich von 30 bis 70 °C durchführt.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die chromatographische Trennung auf einer Säule durchführt, deren Belag keine funktionellen Gruppen aufweist.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man die chromatographische Trennung mit Laufmitteln durchführt, die ausgewählt sind aus der Gruppe der aliphatischen Alkohole mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen.
- 5 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Flüssig/Flüssig-Extraktion unter Verwendung von nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln durchführt.
9. Verwendung von Extrakten der *Litchi sinensis* zur Herstellung von
10 Nahrungsmittelergänzungstoffen.
10. Verwendung von Extrakten nach Anspruch 1 zur Herstellung von kosmetischen und/oder pharmazeutischen Zubereitungen.

Zusammenfassung

EPO - Munich
3
24. Juni 2003

Vorgeschlagen werden pflanzliche Extrakte enthaltend – bezogen auf den Aktivsubstanzgehalt - wenigstens 15 Gew.-% an oligomeren Proanthocyanidinen des Typs OPC A2, die dadurch erhältlich sind, dass man

- (a) Schalen der Früchte von *Litchi sinensis* einer Extraktion mit niederen, gegebenenfalls wässrigen aliphatischen Alkoholen unterwirft,
- (b) die Extrakte gegebenenfalls nach Konzentration und/oder Filtration einer chromatographischen Trennung unterzieht,
- (c) die bei der Chromatographie anfallende OPC A2-reiche Fraktion einer Flüssig/Flüssig-Extraktion unterwirft und
- (d) die resultierende organische Phase abtrennt.